

HUMAN M-CSF ANTIBODY AND DETERMINATION OF HUMAN M-CSF

Publication number: JP5095794

Publication date: 1993-04-20

Inventor: OMOTO YASUKAZU; MURAGUCHI MASAHIRO;
HIRANO AKENORI; YAMANISHI KAZUYA; TAKAHASHI
MASAYUKI

Applicant: OTSUKA PHARMA CO LTD

Classification:

- international: **A61K39/395; C12N5/10; C12N5/20; C12N15/02;
C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577;
C12R1/91; A61K39/395; C12N5/10; C12N5/20;
C12N15/02; C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53;
G01N33/577; (IPC1-7): A61K39/395; C12N5/20;
C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577**

- European:

Application number: JP19910324972 19911004

Priority number(s): JP19910324972 19911004

Report a data error here

Abstract of JP5095794

PURPOSE:To provide the subject new antibody specifically reacting with human macrophage colony stimulation factor and capable of accurately determining the factor in a specimen in high sensitivity even at a low concentration. **CONSTITUTION:**The objective antibody specifically reacts with human macrophage colony stimulation factor (human M-CSF). The antibody can be produced by immunizing a mammal such as mouse with human M-CSF (derivative) as an immunogen, fusing the plasmacytic cell (preferably spleen cell) of the immunized animal to a plasmacytoma cell of a mammal to form a hybridoma, selecting a clone producing the desired antibody from the hybridoma and cultivating the clone.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-95794

(43) 公開日 平成5年(1993)4月20日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
G 0 1 N 33/53	K	8310-2J		
33/577	B	9015-2J		
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	B
		8828-4B	15/00	C

審査請求 未請求 請求項の数13(全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-324972

(22) 出願日 平成3年(1991)10月4日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年8月25日、
社団法人日本生化学会発行の「生化学Vol. 63, No. 8, 1991」に発表

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72) 発明者 大本 安一

徳島県板野郡松茂町笹木野字八下35-6

(72) 発明者 村口 正宏

徳島県板野郡北島町鯛浜字原95-1第2新
見ハイツ303

(72) 発明者 平野 朱里

徳島県徳島市川内町鈴江北19リツチ、ド。
川内505

(74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトM-CSF抗体及びヒトM-CSFの測定法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、ヒトマクロファージコロニー刺激因子(ヒトM-CSF)に対する抗体、その製造法及び該抗体の利用によるヒトM-CSFの免疫学的精製及び測定法の確立を目的とする。

【構成】 本発明によれば、ヒトM-CSFに特異的に反応することを特徴とするヒトM-CSFモノクローナル抗体及び該抗体を固相化した第1抗体と検体とを反応させ、次いで反応物に他のヒトM-CSF抗体を反応させ、得られる反応複合体と酵素標識抗体とを反応させる3ステップサンドスイッチ法により検体中のヒトM-CSFを測定するM-CSFの免疫測定法が提供される。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトマクロファージコロニー刺激因子に特異的に反応することを特徴とするヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項2】 ヒトマクロファージコロニー刺激因子の蛋白部位をエピトープとして認識する請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項3】 還元剤存在下でヒトマクロファージコロニー刺激因子に反応性を有しない請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項4】 ヒトマクロファージコロニー刺激因子のアミノ酸配列の少なくとも1位Valから151位Thrまでのアミノ酸配列を認識部位にもつ請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項5】 組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞由来のヒトマクロファージコロニー刺激因子を免疫抗原として免疫された哺乳動物の脾細胞と哺乳動物の骨髓腫細胞との融合により得られるハイブリドーマの産生する請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項6】 組換え大腸菌由来のヒトマクロファージコロニー刺激因子を免疫抗原として免疫された哺乳動物の脾細胞と哺乳動物の骨髓腫細胞との融合により得られるハイブリドーマの産生する請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項7】 免疫抗原がプラスミドp

【請求項8】 ハイブリドーマがKOCO571（微生物第12522号）である請求項6に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項9】 ハイブリドーマがKOCO572（微生物第12523号）である請求項6に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項10】 ハイブリドーマがKOCO573（微生物第12524号）である請求項6に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項11】 ハイブリドーマがKOCO574（微生物第12525号）である請求項6に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項12】 ハイブリドーマがMMC-1（微生物第12537号）である請求項6に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体。

【請求項13】 請求項1に記載のヒトM-CSFモノクローナル抗体を固相化した第1抗体と検体とを反応させ、次いで反応物に他のヒトM-CSF抗体を反応させ、得られる反応複合体と酵素標識抗体とを反応させる3ステップサンドスイッチ法により検体中のヒトM-CSFを測定することを特徴とするマクロファージコロニー刺激因子の免疫測定法。

2

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (human macrophage colony stimulating Factor、以下ヒトM-CSFという) に対する抗体、殊にモノクローナル抗体、その製造法及び該抗体の利用、特にヒトM-CSFの免疫学的精製及び測定への利用に関する。

10 【0002】

【従来の技術】 一般に、造血細胞の増殖、分化には特定の増殖及び分化因子が必要とされており、最終的に成熟した各種の血球、例えば赤血球、顆粒球、マクロファージ、好酸球、血小板、リンパ球等になるまでの間には、数多くの分化、増殖因子が関与している〔三浦恭定著、血液幹細胞、中外医学社、1983年〕。之等の中で顆粒球系前駆細胞及びマクロファージ系前駆細胞の増殖、分化を刺激するものとしてコロニー刺激因子 (colony stimulating factor, CSF) が知られており [Metacalf, D., The Hematopoietic Colony Stimulating Factors. Amsterdam, Elsevier (1984)]、かかるCSFには、末梢血の顆粒球に対する増血作用が著しい顆粒球-CSF (G-CSF)、骨髓中で単球-マクロファージの産生を刺激するマクロファージ-CSF (M-CSF) 及び骨髓中から顆粒球や単球の前駆細胞であるCFU-GM (コロニー形成ユニット-顆粒球・マクロファージ (colony-forming unit-granulocyte, macrophage) から顆粒球やマクロファージからなるコロニーを形成させる顆粒球・マクロファージ-CSF (GM-CSF) が知られている。また更に多能性幹細胞に作用するCSFとしてマルチ-CSF (Multi-CSF: IL-3) も知られている。

30

40

【0003】 之等のCSFについては、いずれも遺伝子組換え技術により、ヒトの各種CSF遺伝子がクローニングされており、大量に取得することが可能となっている [Wong, G. G., et al., Science, 228, 810 (1985); Nagata, S., et al., Nature, 319, 415 (1986); Souza, L. M., et al., Science, 232, 61 (1986); Takahashi, M., et al. Biochem. Biophys. Res. commun., 152, 1401 (1988); Wong, G. G., et al., Science, 235, 1504 (1987)]。

50

【0004】 上記CSFの中でM-CSFは、現在骨髓における単球の産生促進作用、成熟単球の機能の亢進

(単球のGM-CSFやG-CSF産生の亢進、単球の抗体依存性殺腫瘍活性の増強、単球の抗体非依存性殺腫瘍活性の増強)、骨髄移植後の白血球回復促進及び生存率の上昇、血中コレステロール低下作用等の各種の生物活性作用が知られている[特表昭63-502271号公報、特表平1-502593号公報、特開平3-2125号公報、Motoyoshi, K., J. J. Clinical Medicine, 48, 323-328 (1990)]。

【0005】上記M-CSFは、その生物活性から癌化学療法及び放射線療法時の共通した欠点である白血球の減少を軽減させるものと考えられ、この点から種々臨床試験が行なわれ、癌化学療法後の白血球減少からの回復を有意に促進しているという結果も報告されている[Motoyoshi, K., et al., Immunobiol., 172, 205 (1986)]。

【0006】該M-CSFは上記の観点から種々の臨床用途に対して医薬品としての臨床研究が行なわれているが、医薬用に大量に精製品を取得するためには精製の各工程にて簡便にヒトM-CSFを検出及び定量する技術の確立が必須となる。また、各種の免疫欠損病や異常免疫応答の研究並びに之等の臨床上の診断のために、ヒトM-CSFの体内レベルと病態との関係が近年注目されるに至り、生体内のヒトM-CSF量を高感度、高精度で定量できる方法の確立が斯界で望まれている現状にある。

【0007】しかし、従来のM-CSFの検出、定量法としては、マウス或はヒト健常人骨髄細胞を用いたコロニー形成法[Metacalf, D., The Hematopoietic Colony Stimulating Factors, Amsterdam, Elsevier (1984)]や慢性骨髄性白血病末梢血リンパ球を用いた放射性同位元素標識チミジンの取り込み法[J. D. Griffin, et al., Blood, 63, 904-911 (1984)]、好中球生存維持アッセイ法[C. G. Begley, et al., Blood, 68, 162-166 (1986)]等の生物学的検出・定量方法が知られている。しかしながら、之等の生物学的検出・定量方法は、一般にアッセイ用試料の入手、測定値の再現性、定量性、感度、迅速性等の点で種々の問題がある。しかも之等従来の方法では、前記各種のCSFが同一活性を示すために、之等を区別しては測定できないという重大な欠点がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来のCSFの検出・定量法にみられる欠点を悉く解消して、CSFの中で特にヒトM-CSFを特異的に測定できる新しい免疫学的手法及び該手法に利用できる新規な抗ヒトM-CSFモノクローナル抗体を提供することを目的

とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的より鋭意研究を重ねた結果、新たにヒトM-CSFに特異的に反応するヒトM-CSFモノクローナル抗体の確率に成功すると共に、その利用によって、従来の生物学的検出・定量法より優れた実用的なヒトM-CSFの定量法の確立にも成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0010】即ち、本発明は、ヒトM-CSFに特異的に反応することを特徴とするヒトM-CSFモノクローナル抗体、特にヒトM-CSFの蛋白部位をエпитープとして認識する上記モノクローナル抗体、還元剤存在下でヒトM-CSFに反応性を有しない上記モノクローナル抗体、ヒトM-CSFのアミノ酸配列の少なくとも1位Valから151位Thrまでのアミノ酸配列を認識部位にもつ上記モノクローナル抗体、組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞由来のヒトM-CSFを免疫抗原として免疫された哺乳動物の脾細胞と哺乳動物の骨髄腫細胞との融合により得られるハイブリドーマの産生する上記モノクローナル抗体、組換え大腸菌由来のヒトM-CSFを免疫抗原として免疫された哺乳動物の脾細胞と哺乳動物の骨髄腫細胞との融合により得られるハイブリドーマの産生する上記モノクローナル抗体、免疫抗原がプラスミドp trp IL-2X-M-CSF101で形質転換された組換え大腸菌由来のヒトM-CSFである上記モノクローナル抗体、ハイブリドーマがKOCO571(微工研菌寄第12522号)、KOCO572(微工研菌寄第12523号)、KOCO573(微工研菌寄第12524号)、KOCO574(微工研菌寄第12525号)及びMMC-1(微工研菌寄第12537号)から選ばれるものである上記モノクローナル抗体に係わる。

【0011】更に本発明によれば、上記本発明のヒトM-CSFモノクローナル抗体を固相化した第1抗体と検体とを反応させ、次いで反応物に他のヒトM-CSF抗体を反応させ、得られる反応複合体と酵素標識抗体とを反応させる3ステップサンドスイッチ法により検体中のヒトM-CSFを測定することを特徴とするヒトM-CSFの免疫測定法も提供される。

【0012】本発明の免疫検定法によれば、ヒトM-CSFのみを他のCSFと区別して高感度、高精度で検出・定量することができる。

【0013】また、本発明のモノクローナル抗体は、上記の通りヒトM-CSFに特異的であるため、その利用によれば例えばアフィニティクロマトグラフィー等の手法によって、ヒトM-CSFの特異的精製をも行なうことができる。

【0014】尚、以下の本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、核酸、制限酵素、その他に関する略号による表

示は、IUPAC、IUPAC-IUBによる命名法または規定或は当該分野における慣用記号に従うものとする。またアミノ酸等に関して光学異性体があり得る場合、特に明記しなければL-体を示すものとする。

【0015】以下、本発明抗体の製造方法及びかくして得られる抗体の利用による酵素免疫法につき順次詳述する。

【0016】本発明抗体は、ヒトM-CSF乃至その同効物（誘導体）を免疫抗原として利用して製造することができる。ここで上記ヒトM-CSFの同効物としては、ヒトM-CSFのアミノ酸配列と少なくとも一部が同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド、例えばヒトM-CSFのアミノ酸配列の一部につき置換、欠失、付加等の改変を行なって得られるヒトM-CSF誘導体が包含される。かかるヒトM-CSF乃至その同効物としては、既に各種のものが知られており、之等は例えばヒトM-CSFをコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的手法により、該遺伝子が宿主細胞中で発現されるような組換えDNAを作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換株を培養することにより製造することができる。

【0017】上記ヒトM-CSFの遺伝子としては、代表的にはM-CSF産生能を有する各種のヒト細胞、より具体的にはAGR-ON〔特開昭59-169489号公報記載の特性を有するヒト白血病T細胞由来のヒト培養株化細胞、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に「ATCC受託No. CRL-8199」として受託〕より分離されたmRNAから、オカヤマーバーグ法〔H. Okayama and P. Berg, *Molecular and Cellular Biology*, 3, 280 (1983)〕やグブラー・ホフマン法〔V. Gubler and B. J. Hoffman, *Gene*, 25, 263-269 (1983)〕等に従い調製されるものを例示できる〔特開平1-104176号公報等参照〕。また上記遺伝子は例えばホスファイト トリエステル法〔*Nature*, 31, 105 (1984)〕等の常法に従い核酸の化学合成等により製造することもできる。之等の方法において一部DNAの化学合成やDNA鎖の切断、削除、付加乃至結合を目的とする酵素処理やDNAの単離、精製乃至複製、選別等の各種操作乃至手段は、いずれも常法に従い得る。例えば上記DNAの単離精製は、アガロースゲル電気泳動法等に従うことができ、核酸配列のコドンの一部の改変は、サイトースペシフィック ミュータジェネシス(Site-Specific Mutagenesis)〔*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 5662-5666 (1984)〕等に従うことができる。上記において所望アミノ酸に対応する遺伝暗号の選択は、特に限定されず、利用する宿主細胞のコドン使用頻度等を考慮して常法に従い

決定できる。また上記方法に従い得られる遺伝子のDNA配列の決定及び確認は、マキシム・ギルバート(Maxam-Gilbert)の化学修飾法〔*Meth. Enzym.*, 65, 499-560 (1980)〕やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法〔Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269-276 (1982)〕等により行ない得る。

【0018】かくして得られるヒトM-CSF遺伝子の利用による遺伝子組換え技術に従うヒトM-CSF乃至その同効物の製造は、一般的遺伝子組換え技術〔*Molecular Cloning*, T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1982)等参照〕に従い、ヒトM-CSF乃至その同効物をコードする遺伝子を含むベクターを作成し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養し、発現・物を精製することにより実施できる。本発明者らは先に、上記遺伝子組換え技術に従うヒトM-CSF乃至その同効物の各種の発現系、即ちCOS細胞発現系、大腸菌発現系、CHO細胞発現系等の確立に成功している〔特開平1-104176号公報参照〕。

【0019】かくして得られる組換えヒトM-CSF乃至その同効物（以下、単に「rhM-CSF」という）は、これをそのまま又はハプテンとして用いて、本発明モノクローナル抗体の製造のための所望の免疫抗原を作成でき、この免疫抗原の利用による本発明抗体の製造は、基本的には公知の方法に従うことができる〔Hanfland, P., *Chem. Phys. Lipids*, 15, 105 (1975); Hanfland P., *Chem. Phys. Lipids*, 10, 201 (1976); Koscielak, J., *Eur. J. Biochem.*, 37, 214 (1978)〕。

【0020】該方法としては、より具体的には、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞との融合細胞（ハイブリドーマ、hybridoma）を作成し、これよりヒトM-CSFを認識する所望抗体（モノクローナル抗体）を産生するクローンを選択し、該クローンの培養による方法を採用できる。

【0021】上記方法において、免疫抗原で免疫される哺乳動物としては、特に制限はなく各種のものをいずれも使用できるが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。免疫は一般的方法により、例えばrhM-CSF又はこれを結合試薬により適当な担体に結合させて得られる免疫抗原を、哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等により投与することにより実施できる。例えばマウスの場合、より具体的には、免疫抗原を生理食塩水含有リン酸緩衝液(PB

S)や生理食塩水等で適当な濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2~14日毎に数回投与し、総投与量が約100~500 μ g/マウス程度になるようにするのが好ましい。上記アジュバントとしては、例えば百日咳ワクチン、完全フロインドアジュバント、アラム等を用いることができる。免疫細胞としては、上記免疫抗原の最終投与の約3日後に免疫された動物より摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

【0022】上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えばX63 (p3/X63-Ag8) [Nature, 256, 495-497 (1975)], p3U1 (p3/X63-Ag8. U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], NS-1 (p3/NS-1-Ag4-1) [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)], MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)], SP2/0 (Sp2/0-Ag14) [Nature, 276, 269-270 (1978)], FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)], X63. 6. 5. 3. [J. Immunol., 123, 1548-1550 (1979)], S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]等や、ラットにおけるR210 (210. rcy3. Ag1. 23. (Y3)) [Nature, 277, 131-133 (1979)]等の骨髓腫細胞等を使用できる。

【0023】上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスタイン (Milstein) らの方法 [Method in Enzymology, (73), 3 (1981)]等に準じて行なうことができる。より具体的には、上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等の存在下に、通常の培地中で実施され、培地には更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。また、電気処理 (電気融合) による方法等を適宜採用することもできる。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の方法と変りはなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約1~10倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては上記形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えばRPMI-1640培地、MEM培地、その他のこの種細胞培養に一般に利用されるものを使用でき、通常之等培地は牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を抜いておくのが好ましい。融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば平均分子量100

0~6000程度のものを、通常培地に約30~60w/v%の濃度で加えて混ぜ合わせるにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心分離し、上清を除去する操作を繰返すことにより所望のハイブリドーマが形成される。

【0024】得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地) で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (未融合細胞等) が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び単クローン化に供することができる。

【0025】目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法 (Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980))、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー (Ouchterlony) 法、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法 [「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日] に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原が利用できる。かくして得られるヒトM-CSFを認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素中で長期間保存することができる。

【0026】上記ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを常法に従って培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、硫酸アンモニウム分画、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製できる。

【0027】得られる本発明モノクローナル抗体は、上記粗精抗体液、即ち抗体産生ハイブリドーマ培養上清乃至マウス腹水の形態のままで、或は之等のクロマトグラフィー等による精製品の形態で利用して、例えば免疫沈降法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により、ヒトM-CSFを簡便且つ特異的に精製することができる。

【0028】また、本発明モノクローナル抗体の利用によれば、検体中のヒトM-CSFを免疫反応により、特異的に測定することができる。該方法としては、通常の競合法、サンドイッチ法によるラジオイムノアッセイ法 (RIA)、免疫測定法 (ELISA)、凝集法等の通常の免疫学的手法をいずれも採用でき、之等の方法の操

作、手順等は常法と異なるところはない。

【0029】本発明は、上記本発明モノクローナル抗体を用いた3ステップサンドイッチ法をも提供するものである。この方法は、例えば代表的には以下のごとくして実施される。即ち、96ウェルプレート等の適当な担体に固相化させた本発明抗体を第1抗体として用い、これとヒトM-CSF標準溶液及び測定物質（臨床血液サンプル等のヒトM-CSFを含有する検体）等とを、室温にて一夜静置反応させ【第1ステップ】、次いで、第2抗体としての抗ヒトM-CSF家兎抗血清（家兎抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体）を上記プレートに加え、室温にて2時間程度反応させることにより、該第2抗体と第1ステップでの反応物（本発明モノクローナル抗体と測定物質との反応物）とを反応させ【第2ステップ】、更に酵素標識抗家兎IgG抗体等の標識抗体の一定量を、上記第2ステップでの反応物（本発明抗体と測定物質と二次抗体との反応複合体）と室温にて2時間程度反応させ【第3ステップ】、次いで上記第3ステップで得られた反応複合体と標識抗体との結合体から非結合標識抗体を分離除去した後、発色溶液を加えて発色反応させ、2N硫酸にて発色反応を停止させ、得られる発色反応液の吸光度を測定することにより実施される。かくして検体中のヒトM-CSFを定量することができる。

【0030】上記において第2抗体としては、第1抗体として用いた本発明モノクローナル抗体とは別の本発明モノクローナル抗体を用いることもできる。また、第1抗体として家兎抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を用い、第2抗体として本発明モノクローナル抗体を用いることもできる。更に3ステップサンドイッチ法においては、第1抗体として家兎抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を用い、第2抗体として羊抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を用いる（第1抗体が家兎ポリクローナル抗体で第2抗体が羊ポリクローナル抗体である）こともでき、その逆、即ち第1抗体として羊ポリクローナル抗体を用い、第2抗体として家兎ポリクローナル抗体を用いることも可能である。

【0031】上記ヒトM-CSFの測定法において、第1抗体、即ち抗ヒトM-CSFモノクローナル抗体（或は家兎又は羊抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体）の不溶化は、常法に従い抗体を不溶性担体に物理的又は化学的に結合させることにより実施できる。上記不溶化のための不溶性担体としては、例えばポリスチレン、セファデックス、イオン交換樹脂、プラスチックチューブ、アミノ共重合体等を使用でき、不溶化は共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法、Ug1反応による担体結合法等の化学反応、或はイオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法、ガラスビーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等によって行なうことができる。尚、上記第2抗体としてのポリクローナル抗体は、ヒトM-

CSFを認識する限り特に限定はなく、例えば本発明抗体もしくはその製法において開示した免疫抗原を哺乳動物に投与して生体内に産生される抗血清を使用することができる。

【0032】上記第3ステップで用いられる標識抗体としては、公知のものでよく、既に市販のマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、馬、牛等の動物に免疫して得られる抗血清をパーオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ等で酵素標識した抗イムノグロブリン抗体、例えばパーオキシダーゼ（POD）標識ヤギ抗家兎IgG抗体やパーオキシダーゼ（POD）標識ヤギ抗マウスIgG抗体等を使用することができる。

【0033】上記測定法において、検体として用いられるサンプルとしては、例えば血清もしくは血漿形態の血液、細胞組織液、リンパ液、胸腺水、腹水、羊水、胃液、尿、脾臓液、骨髓液、唾液等の各種体液のいずれでもよいが、血液、特に血清又は血漿が好ましい。

【0034】上記において測定系に利用される溶媒としては、反応に悪影響を与えない通常の各種のものをいずれも利用でき、例えばクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液等のpHが約5.0～9.0程度の緩衝液の利用が好ましい。尚、本発明においては、上記溶媒に、約0.1～3.0w/v%程度の血清（測定対象のヒトM-CSFが含まれていないもの）及び/又は約0.1～2M程度のNaClを含ませるのが、上記測定法の目的により合致して好ましい。

【0035】測定の際の免疫反応条件は、特に制限はなく、通常のこの種測定法と同様のものとして行うことができる。一般には約45℃以下、好ましくは約4～40℃程度の温度条件下に、約1～80時間程度を要して免疫反応を行なえばよい。

【0036】本発明抗体を用いたヒトM-CSFの上記測定法では、上記免疫反応終了後の固相-液相（前記第3ステップでの反応複合体と標識抗体との結合体-非結合標識抗体）の分離を、例えば遠心分離、濾別、デカンテーション、洗浄等の通常の方法により行なうことができる。

【0037】またかくして分離された各物質の酵素標識活性の測定は、使用した酵素の種類に応じて、公知の各種方法に従い実施することができる。その際用いられる発色溶液としては、通常のもの、例えば酵素としてパーオキシダーゼを用いる場合には、o-フェニレンジアミン（OPD）等を用いることができ、発色反応の停止も常法に従い例えば反応液に1～4Nの硫酸等の適当な酵素活性阻害剤を添加することにより実施できる。

【0038】かくして、本測定方法によれば、臨床血液サンプル等の微量のヒトM-CSFを含有する試料を検体として、該検体中のヒトM-CSFを高精度、高感度をもって、しかも簡便な操作で定量することができる。

【0039】上記ヒトM-CSFの測定法の実施に特に便利な方法は、試薬として前記第1抗体、第2抗体及び標識抗体を含有する測定キットを利用する方法である。該キット中のヒトM-CSF試薬中には、例えばグリセロールや牛血清蛋白等の安定化剤及び／又は保存剤を添加存在させることができる。この抗体試薬は好ましくは凍結乾燥したものであるのがよく、該キットには水溶性もしくは水と混和し得る溶媒を含有させることもできる。更に抗体試薬には再構成された試薬系を一定のpHに保つための緩衝液や試料が悪化するのを防止するための保存剤及び／又は安定剤を配合することができる。緩衝液はキット試薬の必須成分ではないが本測定法を実施する際にpHを約5.0～9.0とするものを用いるのが好ましい。また再構成剤は、好ましくは水を含んだものであるが、該水の一部又は全部を水と混和し得る溶媒で置き換えることもできる。この水と混和し得る溶媒としては、よく知られている例えばグリセリン、アルコール類、グリコールエーテル類等を例示することができる。

【0040】

【発明の効果】本発明によれば、ヒトM-CSFに特異的な抗体、特にモノクローナル抗体が提供される。該モノクローナル抗体の利用によれば、測定感度が極めて高く、特異性に優れ、従って例えばヒトの臨床サンプル等の極めて低濃度のヒトM-CSFを含有する検体中の該ヒトM-CSFをも正確に測定可能な免疫検定法による測定手法が提供される。

【0041】

【実施例】以下、参考例及び実施例を挙げて本発明を更に詳述するが、本発明は之等各例に限定されるものではない。尚、参考例1は本発明で免疫抗原として使用するCHO細胞で発現されるヒトM-CSF（誘導体）の製造例、参考例2は大腸菌で発現されるヒトM-CSF（誘導体）の製造例である。之等各参考例は、PCT国際公開第WO91-06567号公報に記載の方法に従うものであり、各例では製造されるヒトM-CSFを次のように定義する。即ち大腸菌（*E. coli*）を宿主としてヒトM-CSFのアミノ酸配列の1位Valから151位Thrまでのアミノ酸を含む発現ベクターにて産生されたM-CSF分子を“*E. coli* [3-153] M-CSF”と呼ぶ。尚、このカギ括弧内番号はCHO細胞で産生されるM-CSFはそのN末端域が1位Valの上流に更に2アミノ酸残基（Glu-Glu）を蒸された構造を採ることによるものである。また参考例1で得られるCHO細胞を宿主として、32個のアミノ酸配列よりなるシグナルペプチド及び522個のアミノ酸配列よりなる成熟ヒトM-CSF蛋白質をコードする発現ベクターにより産生されるヒトM-CSFを“CHO [-32-522] M-CSF”と呼ぶ。

【0042】更に、各例で得られる試料のCSF活性

は、以下の方法により測定されるものとする。

【0043】

【CSFの活性測定法】牛胎児血清（FCS）20ml、 α -培地30ml及び2倍濃度 α -培地20mlを混和して得られる溶液を37℃にて保温し、その23.3mlを予め50℃に保温した1%寒天（ディフコ社製）溶液10mlと混合して37℃に保温する。

【0044】一方Balb/C系マウス大腿骨より採取した骨髓細胞（BMC）を、ハンクス液で2回洗浄後、 α -培地にて細胞濃度が 10^7 個/mlとなるように調製し、その1mlを上記37℃に保温してある寒天培地に加えてよく混和した後、37℃に保温し、次いでその0.5mlを、予め50 μ lの供試試料を入れたウェル（ティッシュカルチャークラスター12、コスター社製）に加えて手早く混和して室温に放置する。各ウェルの寒天が固化するのを待って炭酸ガスインキュベーターに移し、更に37℃で7日間培養する。

【0045】かくして生じたコロニー数を実体顕微鏡を用いて計測し、CSF活性の指標とする。またCSF活性の単位（U/ml）は、上記コロニー数より、次式（a）に従って算出した値を用いた。

【0046】CSF活性単位（U/ml）＝（コロニー数） \times （希釈倍率） \div 1.5（a）

尚、上記で生じるコロニーは形態学的及び酵素化学的観察の結果、殆んどすべてがマクロファージコロニーであった。

【0047】

【参考例1】CHO [-32-522] M-CSFの製造

PCT国際公開第WO91-06567号公報に記載の参考例1に従って、CHO細胞を培養して得られた培養上清液の濃縮液930mlを硫酸分画して25～65%の硫酸沈殿画分を得た後、蒸留水に溶解して（1180ml）、以下の精製工程により目的の均質なCHO [-32-522] M-CSFを得た。尚、以下の工程において目的蛋白はウエスタンブロッティング法に従い検出した。該ウエスタンブロッティングは、バイオ・ラッド社のトランスブロットセルを用いて行ない、トランスファされたニトロセルロース膜を1%スキムミルク含有PBS-にてブロッキング後、M-CSFに対するウサギ抗血清と反応させ、更にパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体（バイオ・ラッド社製）を反応させた。M-CSFのバンドの検出は、得られたニトロセルロース膜と発色基質である4-クロロ-1-ナフトール液とを反応させることにより行なった。上記で得られた培養上清のCSF活性は 2×10^4 単位/mlであった。

【0048】（1）ConA-セファロースクロマトグラフィー

約500mlのConA-セファロースゲルを充填したカラム（5 \times 25cm）を0.15M NaCl含有2

0 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) にて平衡化した後、上記溶解液をアプライし、同緩衝液にて十分に洗浄後、0.5 Mメチル- α -D-マンノシドを含む同緩衝液にて溶出を行なった。全溶出液をYM-10膜を用いた限外濾過により濃縮後、20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に緩衝液を交換した後 (40 ml)、以下の条件で5回に分けて陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーに供した。

【0049】 (2) 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー

カラム: TSKゲルDEAE-5PW (21.5 mm ID \times 15 cm, トーソー社製)

溶出液A: 40 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

溶出液B: 1.0 M NaCl含有40 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

流速: 3.0 ml/分

フラクション容積: 6 ml/チューブ/2分

濃度勾配	時間 (分)	B%
	0	0
	10	0
	20	10
	95	30
	100	100
	110	100
	115	0
	130	0

上記溶出の結果、目的のM-CSFはフラクションNo. 26~43に溶出され、主たるM-CSF画分であるフラクションNo. 30~39をプールして、限外濾過濃縮 (YM-10膜使用) した後 (15 ml)、4回に分けて以下の精製を行なった。

【0050】 (3) TSKゲルフェニル-5PWRP逆相高速液体クロマトグラフィー

カラム: TSKゲルフェニル-5PWRP (7.5 mm ID \times 75 mm, トーソー社製)

溶離液A: 0.1% TFA

溶離液B: n-プロパノール: 1% TFA (9:1)

流速: 3 ml/分

フラクション容積: 1.5 ml/チューブ/0.5分

濃度勾配	時間 (分)	B%
	0	0
	10	0
	20	20
	100	45
	120	100
	130	100
	140	0
	180	0

上記溶出フラクション中のM-CSF画分をプールし

た後、限外濾過 (YM-10膜使用) にて濃縮し、更にセントリコン30 (アミコン社製) にて濃縮し (1 ml)、3回に分けてゲル濾過高速液体クロマトグラフィーを行なった。

【0051】 (4) ゲル濾過高速液体クロマトグラフィー

カラム: スーパーローズ12HR10/30 (10 mm ID \times 30 cm, ファルマシアLKB社製)

溶出液: 0.3 M NaCl含有20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

流速: 0.8 ml/分

フラクション容積: 0.8 ml/チューブ/1分

上記クロマトグラフィーの結果、M-CSFはフラクションNo. 15~17にかけて溶出され、その中のフラクションNo. 16をプールして実験に供した (5.6 mg、比活性: 3.8×10^7 単位/mg蛋白)。

【0052】 (5) CHO [-32-522] M-CSFのSDS-PAGE

レムリの方法 [Laemmli, U. K., Nature, 277, 680 (1970)] に従い、上記 (4) で得られたCHO [-32-522] M-CSFを、レムリのサンプルバッファー [2-メルカプトエタノールを含むもの (2-ME⁺) 及び含まないもの (2-ME⁻) の両者] の夫々と混合後、95℃で10分間加熱処理し、ミニスラブゲル (ゲル濃度15%) を用いてSDS-PAGEを行なった。分子量マーカーとしてはプレステインドマーカー (パイオ・ラッド社製) を用い、染色はシルバーステイン (和光純薬社製) にて行なった。

【0053】 その結果、非還元条件下 (2-ME⁻ 状態) での分子量は約85000を主成分として、62000~115000にかけて、また還元条件 (2-ME⁺ 状態) では43000を主成分として39000~46000にかけて、夫々スメアしたバンドとして検出された。

【0054】 (6) CHO [-32-522] M-CSFのN末端域アミノ酸配列

上記 (4) で得られたCHO [-32-522] M-CSFのN末端域アミノ酸配列を、気相シーケンサー (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。

【0055】 その結果、N端10個のアミノ酸配列として次の配列が確認された。尚、サイクル7におけるアミノ酸 (X') は同定し得ず、遺伝子構造からCysであると推定した。Glu-Glu-Val-Ser-Glu-Tyr-X'-Ser-His-Met-

【0056】

【参考例2】

(1) プラスミドp trp IL-2X-M-CSF 101の作製

プラスミドp cDM-CSF 11-185 [M-CSF

遺伝子(λcM11cDNA、約2.5kb)を保有するプラスミドp cDM-CSF11から作製した(特開平1-104176号公報参照)を、制限酵素ScaI及びBamHIで消化してScaI-BamHI DNA断片(約450bp)をアガロースゲル電気泳動法により単離、精製した。次いで、得られたDNA断片のScaI切断端にPCT国際公開第WO91-06567号公報参考例2に記載の合成リンカー(A)をT4DNAリガーゼにより連結させ、ScaI切断端側に制限酵素XbaIの切断端を有するXbaI-BamHI DNA断片(約480bp)を得た。

【0057】得られたDNA断片を、ヒトIL-2発現プラスミドp trp IL-2D8Δ(特開昭63-12958号公報参照)のXbaI、BamHI切断部位に挿入して、所望のプラスミドp trp IL-2X-M-CSF101を得た。

【0058】該プラスミドをエシェリヒア・コリHB101株にトランスフォームさせた形質転換体は、「Escherichia coli HB101/p trp IL-2X-M-CSF101」なる名称で、1988年12月26日に工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第2226号(E. coli [3-153] FERM BP-2226)として寄託された。

【0059】(2) E. Coli [3-153] M-CSFの分離、精製

1) 大腸菌からのM-CSF画分の調製

上記(1)で得たプラスミドp trp IL-2X-M-CSF101を保持する大腸菌SG21058株7.5g(湿重量)に、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)1.0mlを加えて十分に攪拌した。次に、リゾチーム4mg/mlを6ml、続けてEDTAを最終濃度が10mMとなるように加え、4℃で15分間攪拌処理し、超音波処理(20KHz、10分間、200W)を行ない、更に10000×g/分で20分間遠心分離を行ない沈渣を得た。これを更に洗浄用緩衝液[2%トリトンX100を含む50mMトリス塩酸、pH7.0]にて洗浄後、同条件で再度遠心分離を行ない、この操作を2回繰返して、M-CSF画分(沈渣)を得た。

【0060】2) M-CSF画分からM-CSFの再構成

上記1)の操作により得られたM-CSF画分に、7M塩酸グアニジン及び25mM2-メルカプトエタノールを含む50mMトリス塩酸(pH7.0)20mlを加え、室温で4時間以上攪拌して溶解させた。この溶解液を、予め0.5mM還元型グルタチオン、0.1mM酸化型グルタチオン及び2M尿素を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)2000mlの入ったビーカー(スターラーにて攪拌)中に徐々に滴下し、その後、4℃にて2日間以上放置した。次に溶液を10000×g

/分で30分間遠心分離して、沈渣を除去して上清を得た。かくして得られた上清中には、再構成したM-CSFが存在している。

【0061】3) M-CSFの精製

上記2)で得た遠心上清の精製を以下の通り行なった。

3-1) イオン交換クロマトグラフィーによる濃縮

予50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化しておいたQAE-セータ・ブレップ100(ファルマシアLBK社製)に上記2)で得た再構成液をかけ、次に上記緩衝液で十分に洗浄後、0.5M NaClを含む上記緩衝液にてM-CSF画分の溶出を行なった。

【0062】3-2) 疎水性高速液体クロマトグラフィー

上記で得られた画分に硫酸アンモニウムを30%飽和溶液となるように加え、10000×g/分で20分間遠心分離し、沈渣を除去して上清を得た。この上清を、45μmミリポアーフィルター通した後、下記条件で疎水性高速液体クロマトグラフィーを行なった。

カラム: TSKゲルフェニル5PW(150mm×21.5mmID、トーソー社製)

溶出液A: 30%飽和硫酸含有40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)

溶出液b: 40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)

流速: 3.0ml/分

フラクション容積: 3.0ml/チューブ/分

濃度勾配:	時間(分)	%B
	0	0
	7	0
	47	100
	52	100
	57	0

上記の結果、M-CSF活性は硫酸濃度6~3%の画分に溶出された。該活性画分を分取し、限外濾過器にて40mMリン酸ナトリウム(pH7.4)に対して溶媒交換を行なった。

【0063】3-3) 陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー

上記3-2)で得た画分を、以下の条件で陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーにかけた。

カラム: TSKゲルDEAE-5PW(21.5mmID×150mm、トーソー社製)

溶離液A: 40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)

溶離液B: 1.0M NaCl含有40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)

流速: 3.0ml/分

17

フラクション容積: 3.0ml/チューブ/分

濃度勾配:	時間 (分)	%B
	0	0
	5	0
	43	30
	48	100
	53	100
	58	0

上記陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーの結果 (溶出パターン) より、フラクションNo. 35及び36 (0.28~0.29M NaCl濃度) に認められるピークがM-CSFに相当し、該ピークを集めて大腸菌から精製M-CSF (E. coli [3-153] M-CSF) を得た。

【0064】(4) E. coli [3-153] M-CSFのSDS-PAGE

レムリの方法 [Laemmli, UK., Nature, 277, 680 (1970)] に従い、上記(3) で得られたE. coli [3-153] M-CSFの上清をサンプルとして、レムリのサンプルバッファー [2-メルカプトエタノールを含むもの (2-ME⁺) 及び含まないもの (2-ME⁻) の両者] の夫々と混合後、95℃で10分間加熱処理し、ミニスラブゲル (ゲル濃度15%) を用いてSDS-PAGEを行なった。

【0065】その結果、非還元条件下 (2-ME⁻ 状態) での分子量は約32000を主成分としており、また還元条件 (2-ME⁺ 状態) では約17000を主成分としていることが検出された。上記(3) で得られたE. coli [3-153] M-CSF精製標品の比活性は 4×10^7 単位/mgであった。

【0066】

【実施例1】本発明モノクローナル抗体の製造

① CHO [-32-522] M-CSFを抗原とするモノクローナル抗体の製造

参考例1で製造したCHO [-32-522] M-CSFを免疫抗原として用いて、その20μgを等量のフロインド完全アジュバント液と混合乳化させ、これを40μg/マウスずつ、雄性Balb/c系マウス (8週齢) に腹腔内投与して免疫した。その後同様に3回、2週間おきに同免疫抗原液の同量を同経路で追加投与して免疫した。2~3週間後に最終免疫として20μgの抗原液を静脈内投与して免疫した。以下の操作は全て無菌的に行ない、試験は37℃に保って行なった。上記最終免疫の2~3日後に、マウスから脾臓を摘出し、摘出脾臓より脾細胞を取り出し、10mlのRPMI-1640培地 (日水製薬社製) の中で攪拌した。次に遠心分離 (1500rpm, 5分間) して細胞ペレットをかきとり、該ペレットに細胞中に存在する赤血球を0.83%塩化アンモニウム緩衝液で1~2分間処理して融解除去した。上記で得られた細胞を感作リンパ球細胞として集

18

め、これを37℃に加温したRPMI-1640培地で3回洗浄した。

【0067】次に、マウス骨髄腫細胞 [P3U1, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 73, 3 (1981)] を、15%FCS (牛胎児血清) を含有するRPMI-1640培地に8-アザグアニン100μMを加えた培地中で継代培養し、これをミエローマ細胞として用いて、上記リンパ球細胞と同様に洗浄した。

10 【0068】上記脾細胞とミエローマ細胞とを、細胞数比が10:1になるように50mlのチューブ内で混和し、得られた細胞混合物を500×gで5分間遠心分離後、上清をバスツールピペットで完全に除去し、ペレットをよくほぐした。之等の操作は37℃に保温した水槽内で行なった。次に、45%ポリエチレングリコール-4000 (ベリング・マンハイム・山之内社製、以下「PEG」という) 2mlを、ゆっくりと30秒間かき混ぜながら滴下した後、30秒間放置し、次いでFCSを含まないRPMI-1640培地5mlをゆっくりと2分間位をかけて加えて1分間放置し、更に同液5mlを加えて3分間放置した後、遠心分離 (1500rpm, 5分間) し、上清をバスツールピペットで除去し、得られたペレットを50mlの10%FCS含有RPMI-1640培地に細胞懸濁液 1×10^5 個/mlとなるように懸濁させた。

30 【0069】次に、上記懸濁液を24穴のプレート (コースター社製) 4枚に1ml/ウェルずつ分注し、37℃、5%CO₂、100%湿度のインキュベーター内で培養した。24時間後、1ml/ウェルずつ10%FCS添加ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M及びチミジン 1.6×10^{-5} Mを含むRPMI-1640培地 (以下これを「HAT培地」という) を各ウェルに添加した。以後、上清を2日目、3日目に培地の半分ずつ吸引し、同量の新しいHAT培地を加えて液替えを行なった。その後、液替えは2~3日おきに行なった。6日目に同様に上清を吸引し 1×10^{-4} Mヒポキサンチン及びチミジン 1.6×10^{-5} Mを含むRPMI-1640培地 (以下これを「HT培地」という) に替えた。以後、RPMI-1640培地で増殖維持した。融合後、7~10日間でコロニーが肉眼で観察されるようになり、細胞が24穴プレートの底面積の1/4を占めた時より、上清を参考例1で得たCHO [-32-522] M-CSFを抗原とする酵素免疫測定法 (ELISA法) で試験してスクリーニングし、陽性となったウェルのハイブリドーマを直ちに限界希釈法 [Method in Enzymology, 73, 3 (1981)] によりクローニングした。

50 【0070】即ち、ELISA用96穴ウェルマイクロプレート (ヌンク社製) に、免疫感作に用いた免疫抗原CHO [-32-522] M-CSFをPBS (シグマ

社製、製造NO. P-4417)中に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈した抗原溶液を上記イムノプレートに $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ分注し、 4°C で2時間静置してコーティングを行なった。次に、抗原溶液を除去した後、 0.1% 牛血清アルブミン(BSA)及びPBSをそれぞれ $400\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ加え、室温で1時間静置した後、 0.1% BSA及びPBSを除去し、上清を $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ加えた。室温で一晩インキュベートした後、 0.05% ツイーン(Tween)-20及びPBSでウェルを3回洗浄した。次に、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ のHRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)標識抗ウサギIgG抗体(バイオ・ラッド社製)を加え、室温にて2時間インキュベートした後、 0.05% ツイーン-20及びPBSで5回洗浄した。最後に、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ のオルトフェニレンジアミン(OPD)基質液[4mg OPD(シグマ社製、製造No. P-8287)、 $4\mu\text{l}$ 30%過酸化水素水及び 10ml クエン酸緩衝液(PH5.0)=OPD緩衝液(シグマ社製、製造No. P-4922)]を加え、充分発色させた後、 2N 硫酸溶液 $50\mu\text{l}$ を各ウェルに加えて反応を停止させた。基質液の発色を、エライザーアナライザー(タイターテック社製)を用いて 490nm の吸光度により測定した。

【0071】上記ELISAにて陽性を示したウェルのハイブリドーマを直ちに限界希釈法[Method in Enzymology, 73, 3(1981)]によりクローニングした。即ち、Balb/c系マウス脾細胞をフィーダー細胞として、 10% FCS添加RPMI-1640培地に希釈し、96ウェルプレートに 2×10^6 個/ $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ となるように調製して分注した。上記ELISAで発色したウェルの細胞を3個/ ml となるように 10% FCS添加RPMI-1640培地で希釈し、96ウェルプレートに $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ分注した。クローンがある程度増殖してきたら、再び上記と同様の方法にてスクリーニングを行ない、シングルクローンのものは腹水化もしくは凍結保存し、その他は再度同一クローニングを行なった。

【0072】上記クローニング(3回)により、所望の反応特異性を有する本発明モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ5株を得た。之等をそれぞれ「KOCO571」～「KOCO575」と命名した。また之等各ハイブリドーマの産生する本発明モノクローナル抗体は、それぞれハイブリドーマの番号と対応させて「ANOC571」～「ANOC575」と命名する。

【0073】上記で得られたクローンNo. KOCO571～KOCO575のそれぞれを、 50ml のフラスコ内にて、RPMI-1640培地にて $5\%\text{CO}_2$ 条件下で、 37°C にて、96時間培養した。培養液を 3000rpm 、10分間遠心分離して、目的のモノクローナル抗体を含む培養上清を得た。得られたクローンの内の

4株(本発明抗体産生ハイブリドーマKOCO571～KOCO574)を選定した。

【0074】之等モノクローナル抗体産生細胞は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に「KOCO571」～「KOCO574」なる表示で寄託されており、それらの寄託番号は微工研菌寄第12522号(FERM P-12522)、微工研菌寄第12523号(FERM P-12523)、微工研菌寄第12524号(FERM P-12524)及び微工研菌寄第12525号(FERM P-12525)である。

【0075】②腹水の作製

上記①で得た各ハイブリドーマを上記培養液で $5\%\text{CO}_2$ 条件下に、 37°C にて48時間、 50ml フラスコ内で培養した後、培養液を 500rpm 、5分間遠心分離し、得られたペレットを 2.5ml のPBSに懸濁させた。

【0076】次に、予め2～3日前にプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、アルドリッチ社製)を接種しておいたBalb/c系マウス5匹に、1匹当たり 0.5ml ずつ上記細胞懸濁液を腹腔内投与し、10～14日後に、蓄積された腹水を最初の1匹だけは無菌的に採取して、本発明抗体を含む腹水を得た。上記腹水を 1500rpm 、5分間遠心分離した。ペレットは $10\%\text{DMSO}$ (ジメチルスルホキシド)及び $10\%\text{FCS}$ 添加RPMI-1640培地に懸濁させ、冷凍保存した。上清は残りの4匹の腹水と合わせて引き続き精製に用いた。

【0077】③抗体の精製

該腹水からの所望抗体の精製は、抗体精製キット(Bio-Rad MAPS-II Kit、バイオ・ラッド社製)を用いて行なった。即ち、予めプロテインAカラムを約 20ml の結合緩衝液で平衡化し、上記②で得られた各腹水に倍量の結合緩衝液を加えて混和し、 4°C で2時間静置後、 3000rpm 、30分間遠心分離した。得られた上清を $45\mu\text{m}$ のメンブランフィルター(マイレクスHA:ミリポア社製)で濾過した。濾液をプロテインAカラムにアプライし、約 30ml の結合緩衝液で洗浄した。次に、 10ml の溶出緩衝液でIgGを溶出し、 1M トリス塩酸緩衝液 1ml を加えて中和した。更にPBSに対して 4°C で一晩透析した。得られた透析液を用いて、 280nm の吸収を測定し、抗体濃度を決定した。

【0078】該精製抗体濃度は、ANOC571が $0.42\text{mg}/\text{ml}$ であり、ANOC572が $0.60\text{mg}/\text{ml}$ であり、ANOC573が $1.39\text{mg}/\text{ml}$ であり、ANOC574が $0.60\text{mg}/\text{ml}$ であった。

【0079】

【実施例2】本発明モノクローナル抗体の性状以下、上記で得られた本発明抗体の特性を示す。

①抗体のサブクラス

CHO [-32-522] M-CSF抗原をPBSで希釈して10 μ l/mlとし、イムノプレートに100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で2時間静置してコーティングを行なった。次に、抗原溶液を除去した後、0.1%BSA及びPBSを400 μ l/ウェルずつ加え、室温で1時間静置した後、0.1%BSA及びPBSを除去し、上清を100 μ l/ウェルずつ加えた。室温で一晩インキュベート後、0.05%ツイーン-20及びPBSでウェルを3回洗浄した。

【0080】次に、抗マウスIgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃及びIgMポリクローナル抗体(ウサギ)(以上いずれもバイオネティクス社製)を0.1%BSA及びPBSで1000倍に希釈し、100 μ l/ウェルずつ添加した。室温で、2時間インキュベート後、0.05%ツイーン-20及びPBSで3回洗浄した。

【0081】次にHRP標識ウサギIgG抗体(バイオ・ラッド社製:カタログNo. 170-6515)を0.1%BSA及びPBSで5000倍に希釈して100 μ l/ウェルずつ加え、室温で2時間インキュベート後、0.05%ツイーン-20及びPBSで5回洗浄した。最後に、100 μ l/ウェルの基質溶液を加え、約5~10分間発色反応させ、充分に発色させた後、2N硫酸溶液を100 μ l/ウェルずつ加えて反応を停止させた。

【0082】上記発色反応の結果、本発明CHO[-32-522] M-CSFモノクローナル抗体のサブタイプは表1に示す通りであった。

*【0083】

【表1】

抗体名	タイプ
ANOC571	IgG ₁
ANOC572	IgG ₁
ANOC573	IgG ₁
ANOC574	IgG ₁

10

【0084】②抗体産生レベル

実施例1-①で得られた培養上清を遠心分離し、得られる上清を10%FCS添加RPMI-1640培地に、37℃、5%CO₂の条件で10日間インビトロで培養した。ハイブリドーマが最大細胞密度となった時の培養上清中のKOCO571のIgG₁量は約10 μ g/mlであり、KOCO572のIgG₁量は約11 μ g/mlであり、KOCO573のIgG₁量は約15 μ g/mlであり、またKOCO574のIgG₁量は約9 μ g/mlであった。

【0085】③抗体の力価

参考例1で得られたCHO[-32-522] M-CSFをヨードゲン法にて¹²⁵Iを標識して、この標識体10kcpmの内、50%と結合できる抗体の濃度を抗体価として求めた。得られた各抗体の抗体価を下記表2に示す。

【0086】

【表2】

*

抗体名	力価 (濃度)
ANOC571	1.36 μ g/ml
ANOC572	2.80ng/ml
ANOC573	2.12ng/ml
ANOC574	344ng/ml

【0087】上記より、各抗体の力価はANOC573>ANOC572>ANOC574>ANOC571の順であることが判る。

【0088】④中和活性

マウスの骨髓細胞を使用したコロニーアッセイ法で中和活性を求めた。

【0089】その結果、ANOC573の中和活性は、該ANOC573の1ml当りでCHO[-32-522] M-CSFを1.80 \times 10⁵単位中和できるものであった。また、ANOC572では5.68 \times 10⁴単位中和できるものであった。更に、ANOC574とANOC571は検出限界以下であった。尚、上記注を

活性は、M-CSF500単位を50%中和する活性を中和250単位として求めたものである。

【0090】⑤SDS-PAGE

レムリの方法に従い、各精製抗体10 μ lと等量のレムリのサンプルバッファー(2Me⁺)とを混合し、95℃で10分間加熱処理し、ミニスラブゲル(15%アクリルアミド)を用いて、SDS-PAGEを行なった。尚、上記SDS-PAGEに使用したSDSは和光社製であり、分子量マーカーとしては、ホスホリラーゼB(分子量94000)、アルブミン(分子量67000)、カルボニックアンヒドラーゼ(分子量30000)、トリプシンインヒビター(分子量20100)及

び α -ラクトアルブミン(分子量14400) [いずれもファルマシア社製]を用いた。

【0091】その結果、SDS-PAGEによる重鎖と軽鎖の分子量の和から、本発明抗体の分子量は、ANOC571が160kdであり、ANOC572が155kdであり、ANOC573が158kdであり、またANOC574が150kdであると確認された。

【0092】⑥ウエスタンブロッティング

また、ウエスタンブロッティングをトービンらの方法 [Harry Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 76, 4350 (1979)] に従って、LBK社製セミドライプロッターを用いて行なった。即ち、参考例1で得たCHO [-32-522] M-CSF免疫抗原をレムリの方法に従いレムリのサンプルバッファー [2ME⁻ 及び2ME⁺] のそれぞれ等量と混合し、95℃で10分間加熱処理し、ミニスラブルゲル(15%ポリアクリルアミド)を用いてSDS-PAGEを行なった。上記電気泳動後、ニトロセルロース膜に膜蛋白を転写し、洗浄液 [0.5%ツイーン-20、PBS (pH7.2)] にて洗浄後、1%スキムミルク及びPBSで室温で一晩処理した。再び洗浄後、実施例1で得た本発明の各抗CHO [-32-522] M-CSFモノクローナル抗体液10 μ g/mlと室温で2時間反応させた。PBSで3回洗浄した後、1000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(バイオ・ラッド社製)液に浸し、室温で2時間静置反応させた。前記洗浄液で3回洗浄後、発色基質である4-クロロ-1-ナフトール液にニトロセルロース膜を浸して発色させた。バンドが現れた時点で、蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

【0093】尚、上記においてプレステイン分子量マーカーとしては、ホスホリラーゼB(分子量106000)、ウシ血清アルブミン(分子量80000)、オボアルブミン(分子量49500)、カルボニックアンヒドラーゼ(分子量32500)、ダイズトリプシンインヒビター(分子量27500)及びリゾチーム(分子量18500) [いずれもバイオ・ラッド社製]を用いた。

*

抗 体 名	力価(希釈倍率)
OCT511	$\times 80000$
OCT512	$\times 48000$
OCT513	$\times 52000$

【0101】②中和活性
マウスの骨髓細胞を使用したコロニーアッセイ法で中和活性を求めた所、OCT511の中和活性は、OCT511の1ml当りでCHO [-32-522] M-CS

* 【0094】上記ウエスタンブロッティングの結果を第1図に示す。

【0095】該図より、CHO [-32-522] M-CSFは、2ME (-) においてのみ分子量約85kdのバンドとして認められることが判る。

【0096】

【実施例3】抗CHO [-32-522] M-CSFポリクローナル抗体の製造

①参考例1で得たCHO [-32-522] M-CSF精製品1mg/mlをPBSに溶解させ、これにフロインドの完全アジュバント液を等量加えて懸濁液を作成した。この懸濁液を数羽の家兎(New Zealand White Rabbit、体重2.5~3.0kg)に、CHO [-32-522] M-CSFを免疫抗原として1回量40 μ g/ウサギとなる量で、1ヶ月毎に皮下投与して免疫した。最初の免疫を合わせて合計7回免疫し、最終免疫の1週間後に各ウサギより全採血して抗血清を得た。得られた抗血清より、石川らの方法 [J. Immunoassay, 4, 209 (1983)] に従って、硫酸分画及びジエチルアミノエチルセルロースカラム分画を行なってIgGを採取し、これを精製品CHO [-32-522] M-CSFを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製して、所望のウサギ抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を得た。

【0097】得られた抗体(3種)を「OCT511」、「OCT512」及び「OCT513」と命名する。之等は-80℃で保存された。之等の内、OCT511については、前述したPCT特許国際公開WO91-06567号公報に詳述されている。

【0098】以下、上記で得られた抗体の性質を示す。

【0099】①抗体力価

CHO [-32-522] M-CSFを、ヨードゲン法にて¹²⁵Iで標識して、この¹²⁵I標識CHO [-32-522] M-CSFの10kcpmの内、50%と結合できる抗体の希釈倍率を抗体価として求めた。各抗体の抗体力価を下記表3に示す。

【0100】

【表3】

Fを1~2 $\times 10^6$ 単位中和できるものであり、OCT512では同1~2 $\times 10^6$ 単位を中和でき、またOCT513では同1~2 $\times 10^6$ 単位を中和できるものであった。

【0102】③交差反応性

OCT511、OCT512及びOCT513は、いずれもマウスCSF（L-Ce11の培養上清）及びヒトGM-CSF（アマシャム社）と全く交差せず、更にヒトIL-1 α （特開昭63-164899号公報参照）、IL-1 β （特開昭63-152398号公報参照）、IL-2（アマシャム社）、TNF- α （アマシャム社）にもそれぞれ全く交差しなかった。

【0103】

【実施例4】本発明モノクローナル抗体の製造

①抗E. coli [3-153] M-CSFを抗原とするモノクローナル抗体の製造

参考例2で製造したE. coli [3-153] M-CSFを免疫抗原として用いて、実施例1と同様にして所望抗体を製造した。即ち、精製E. coli [3-153] M-CSFにより感作したリンパ球細胞を作成し、これをマウス骨髓腫細胞と融合させて得られたハイブリドーマを培養し、E. coli [3-153] M-CSFを免疫抗原とするELISA法により試験し、陽性となったウェルから限界希釈法によりクローニングを行なった。3回のクローニングの後、所望の反応特異性を有する本発明モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ4株を得た。之等はそれぞれ「MMC-1」～「MMC-4」と命名された。

【0104】上記各クローンを培養後、遠心分離して目的モノクローナル抗体を含む培養上清を得た。得られたクローンの内1株（本発明モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ）を選択した。

【0105】上記モノクローナル抗体産生ハイブリドーマMMC-1は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に「MMC-1」なる表示で寄託されており、その寄託番号は微工研菌寄第12537号（FERM P-12537）である。

【0106】②腹水の作製

上記①で得た各ハイブリドーマを用いて、実施例1-②と同様の方法により腹水を作成した。

【0107】③抗体の精製

上記②で得た腹水からの所望抗体の精製を、抗体精製キット（Bio-Rad MAPS-II Kit、パイオ・ラッド社製）を用いて、実施例1-③同様にして実施した。得られた精製抗体（各起源ハイブリドーマに対応して之等抗体のそれぞれを「MMC-1」～「MMC-4」と呼ぶ）を含有する各透析液を用いて、280nmの吸収を測定し、各抗体濃度を決定した。

【0108】その結果、MMC-1は0.74mg/mlであり、MMC-2は1.00mg/mlであり、MMC-3は0.72mg/mlであり、MMC-4は1.32mg/mlであった。

【0109】

【実施例5】モノクローナル抗体の性状

以下、上記実施例4で得られた本発明抗体の特性を、免疫抗原として参考例2で得た精製品E. coli [3-153] M-CSFを用いて実施例2と同様にして求めた。

【0110】①抗体のサブクラス

各抗体のサブクラスは下記表4に示す通りである。

【0111】

【表4】

抗 体 名	タイプ
MMC-1	IgG ₁
MMC-2	IgG ₁
MMC-3	IgG _{2b}
MMC-4	IgG ₁

【0112】②抗体産生レベル

ハイブリドーマが最大細胞密度となった時の培養上清中のMMC-1のIgG₁量は約12 μ g/mlであり、MMC-2のIgG₁量は約10 μ g/mlであり、MMC-3のIgG_{2b}量は約8 μ g/mlであり、またMMC-4のIgG₁量は約9 μ g/mlであった。

【0113】③抗体の力価

参考例2で得たE. coli [3-153] M-CSFを用いて各抗体の段階希釈液を作成し、之等各抗体溶液と固相化したE. coli [3-153] M-CSFプレートとを反応させて、実施例2-③の方法に従って各抗体の力価を求めた。その結果を下記表5に示す。

【0114】

【表5】

抗 体 名	力 価 （濃度）
MMC-1	200 ng/ml
MMC-2	220 ng/ml
MMC-3	2.50 μ g/ml
MMC-4	1.25 μ g/ml

【0115】④SDS-PAGE

実施例2-⑤と同様にして求めた。その結果、SDS-PAGEによる重鎖と軽鎖の分子量の和から、本発明抗体の分子量は、MMC-1が152kdであり、MMC-2が161kdであり、MMC-3が159kdであり、またMMC-4が155kdであると確認された。

【0116】⑤ウエスタンブロッティング

実施例2-⑥と同様にして、参考例2で得られた精製E. coli [3-153] M-CSFを免疫抗原として可溶化後、ポリアクリルアミドゲルに付し、電気泳動

にかけてウエスタンブロッティングを行なった。その結果、E. coli [3-153] M-CSFは分子量約32kdのバンドとして検出された。

【0117】

【実施例6】抗E. coli [3-153] M-CSFポリクローナル抗体の製造

① 参考例2で得たE. coli [3-153] M-CSF精製品1mg/mlをPBSに溶解させて免疫抗原として用いて、実施例3と同様にして、所望のウサギ抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を得た。

【0118】得られた抗体(3種)を「OCT521」、「OCT523」及び「OCT524」と命名する。之等は-80℃で保存された。

【0119】以下、各抗体の性質を実施例3と同様にして求めた結果を示す。

①抗体力価

E. coli [3-153] M-CSFを、ヨードゲン法にて¹²⁵Iで標識し、この¹²⁵I標識E. coli [3-153] M-CSFの10kcpmの内、50%と結合できる抗体の希釈倍率を抗体力価として求めた結果を表6に示す。

【0120】

【表6】

抗 体 名	力 価 (希 釈 倍 率)
OCT521	× 7 8 0 0 0
OCT523	× 6 4 0 0 0
OCT524	× 6 0 0 0 0

【0121】②中和活性

マウスの骨髓細胞を使用したコロニーアッセイ法で中和活性を求めた所、OCT521は、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 単位で、OCT523では同 $1 \sim 2 \times 10^6$ 単位で、またOCT524では同 $1 \sim 2 \times 10^6$ 単位で、それぞれE. coli [3-153] M-CSFを中和できた。

【0122】③交差反応性

OCT521、OCT523及びOCT524は、いずれもマウスCSF (L-Cellの培養上清) 及びヒトGM-CSF (アマシャム社) と全く交差せず、更にヒトIL-1 α (特開昭63-164899号公報参照)、IL-1 β (特開昭63-152398号公報参照)、IL-2 (アマシャム社) 及びTNF- α (アマシャム社) にもそれぞれ全く交差しなかった。

【0123】

【実施例7】ウエスタンブロッティングによる各抗体の反応性

前記各例で得られたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、CHO [-32-522] M-CSF及びE. coli [3-153] M-CSFの反応性を、ウエスタンブロッティングにより検討した。その結果を表7に示す。

【0124】

【表7】

	E. coli [3-153] M-CSF		CHO [-32-522] M-CSF	
	2ME (-)	2ME (+)	2ME (-)	2ME (+)
OCT 511	(+)	+	++	++
OCT 512	+	(+)	++	++
OCT 513	(+)	+	++	++
OCT 521	++	++	-	-
OCT 523	++	++	-	+
OCT 524	++	++	+	-
MMC-1	-	++	-	-
MMC-2	-	++	-	-
MMC-3	-	-	-	-
MMC-4	-	++	-	(+)
ANOC 571	-	++	-	-
ANOC 572	-	+	-	(+)
ANOC 573	-	++	-	++
ANOC 574	-	+	-	+

【0125】該表は縦に各ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を、横に抗原として用いたCHO [-32-522] M-CSF及びE. coli [3-153] M-CSFをとり、それぞれの反応性を示したものであり、2ME⁺は還元状態での反応を、2ME⁻は非還元状態での反応を示す。また表において、-は反応せずを、(+)は僅かに反応するを、+は反応するを、また++は強く反応するをそれぞれ示す。

【0126】該表より、ポリクローナル抗体の場合、CHO由来のM-CSFで作成したポリクローナル抗体OCT 511~OCT 513は、CHO由来のM-CSFと強く反応するが、大腸菌由来のE. coli [3-153] M-CSFとはあまり反応せず、逆に大腸菌由来のE. coli [3-153] M-CSFで作成したポリクローナル抗体OCT 521~OCT 524は大腸菌由来のE. coli [3-153] M-CSFとは強く反応するが、CHO由来のM-CSFとはあまり反応しないことが判る。また、之等のポリクローナル抗体は還元状態及び非還元状態のいずれの場合も反応性の違いは認められないことが判る。

【0127】モノクローナル抗体の場合、大腸菌由来のE. coli [3-153] M-CSFで作成したモノクローナル抗体MMC-1~MMC-4は大腸菌由来の

M-CSFとは強く反応するが、CHO由来のM-CSFとはあまり反応せず、また還元状態でM-CSFには反応せず、非還元状態で二量体のM-CSFのみに反応することが判る。更に、CHO由来のM-CSFで作成したモノクローナル抗体ANOC 511~ANOC 514は、CHO由来のM-CSF及び大腸菌由来のM-CSFの両者と反応し、二量体のM-CSFにのみ反応することが判る。

【0128】免疫抗原として糖鎖をもつCHO由来のM-CSFを使用して作成したANOC 571~ANOC 574は、大腸菌由来のM-CSF (3-153) と結合することから、蛋白部分を認識することが判った。更にCHO由来のM-CSFはアミノ酸の配列として200以上であると考えられるが、上記各抗体は大腸菌由来のM-CSFと反応することから、之等各抗体の認識部位は3-153であることが判る。

【0129】

【実施例8】モノクローナル抗体間の結合関係

モノクローナル抗体同士でM-CSF分子上で立体障害がなくサンドイッチできる関係を調べる目的で本試験を行なった。モノクローナル抗体の結合部位が判れば、立体的にM-CSFを考察できるデータが得られ、またM-CSFの測定系を作成する上で役立つと考えられ

る。以下に、その試験方法と結果を示す。

【0130】96ウェルプレートに各モノクローナル抗体を100μl/ウェル加え、4℃で1時間以上放置した後、測定用緩衝液[0.1%BSA、500mgチメロザールをダルベッコPBSに添加した緩衝液]にて洗浄後、室温で1時間放置して固相化した各モノクローナル抗体(MMC-1、MMC-2、ANOC571~ANOC574)とビオチン標識したモノクローナル抗体[MMC-1、MMC-2及びANOC571~ANOC574の各抗体を0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.5)にて透析して濃度を1mg/mlとし、この各抗体液1mlと50mg/mlのスルホ-NHS-ビオチン(Sulfo-NHS-Biotin、DMSOに溶解)6μlとを混合し、室温で4時間放置し、4℃でPBSに対して一晩透析し、4℃に保存したもの]をまず*

*作成した後、モノクローナル抗体を固相化した96ウェルプレート上で100ng/mlの参考例1で得られた精製標品M-CSFと室温で一晩以上放置し、充分に反応させた。洗浄液で3回洗浄後、ビオチン標識したモノクローナル抗体各100μlを室温で2時間反応させた後、洗浄液で洗浄し、次いでHRP標識アビジン溶液[0.1%BSA及びPBS]を各ウェルに100μlずつ加え、室温で2時間反応させ、反応液を除去し、各ウェルを洗浄液で洗浄後、OPD緩衝液を各100μlずつ加え、室温で10分間前後反応させた後、2N硫酸を各ウェルに100μlずつ加えて反応を停止させた。HRP活性をOD492nmでOPDの発色を測定して、各抗体同士の結合関係を調べた。

【0131】上記結果を表8に示す。

【表8】

	MMC-1	MMC-2	ANOC571	ANOC572	ANOC573	ANOC574
MMC-1	-	-	-	++	++	+
MMC-2	+	+	+	++	++	-
ANOC571	-	-	-	-	-	+
ANOC572	+	++	+	++	++	+
ANOC573	+	+	+	++	++	+
ANOC574	++	+	++	++	++	-

【0132】該表において、-は結合せずを、+は結合するを、++は強く結合するを、それぞれ示す。

【0133】該表より、最も発色の強い組み合わせは、ANOC571-ANOC574であることが明らかであり、またANOC572、ANOC573は同種の抗体でサンドイッチが形成された。

【0134】

【実施例9】M-CSFの測定方法

①大腸菌由来のE. coli [3-153] M-CSFのELISA法

実施例4で得たE. coli [3-153] M-CSFモノクローナル抗体を第1抗体として固相化し、これに参考例2で得られた精製標品E. coli [3-153] M-CSFを測定用緩衝液で11段階希釈した溶液を反応させ、更に実施例6-①で得たウサギ抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を第2抗体として反応させた後、HRP標識抗家兎IgG抗体を反応させ、基質としてo-フェニレンジアミン(OPD)を用いた本発明の3ステップ固相サンドイッチ法にて以下の通り、本試験を行なった。

【0135】即ち、実施例4で得られた各抗E. coli [3-153] M-CSFモノクローナル抗体(MMC-1~MMC-4)を、4℃下に96ウェルプレートに測定用緩衝液[2gのBSAと500mgのチメロザールを2lのPBS(シグマ社製)に溶解したもの、pH7.2]200mlで希釈して、100μlずつ加え、1時間放置してコーティングを行なった。次に、室温にて上記測定用緩衝液をプレートに350μlずつ加えて1時間ブロッキングを行なった。測定用緩衝液を除去した後、再度測定用緩衝液100μlずつを加え、11段階希釈した参考例2で得た精製標品E. coli [3-153] M-CSFを所定のウェルに100μlずつ加えた。室温で12時間以上(通常一晩)反応させた後、反応溶液を除き、各ウェルに洗浄液(生理食塩水)350μlずつを加えて洗浄した。この操作を3回繰返した。

【0136】次に実施例6-②で得られたウサギ抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体(OCT523)を0.1%BSA及びPBSで2000倍に希釈した抗体溶液を、所定の各ウェルに100μlずつ分注し、室温で2

33

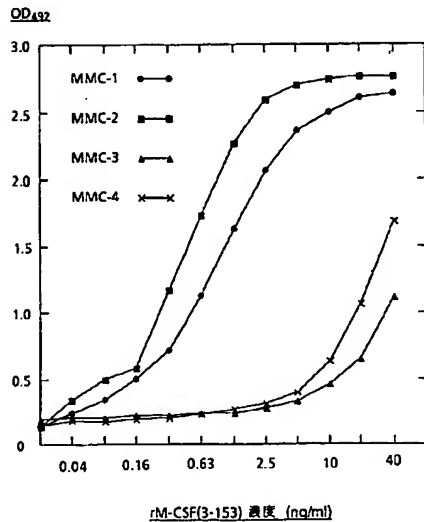
時間反応させた後、反応溶液を除去し、各ウェルに洗浄液を350 μ lずつ加えて洗浄した。この操作を3回繰返した後、HRP標識抗家兎IgG抗体溶液（バイオ・ラッド社製、カタログNo. 170-6515）を所定のウェルに100 μ lずつ加え、室温で2時間反応させた後、反応液を除き、各ウェルに洗浄液を350 μ lずつ加えて洗浄した。この操作を3回繰返した。

【0137】その後、OPD緩衝液〔OPD（シグマ社製、製造No. P-8287）1個をOPD緩衝用タブレット（シグマ社製、製造No. P-4922を100mlの純水に溶解したもの）10mlに溶解したもの〕100 μ lを各ウェルに加え、室温で10分間反応させた後、2N硫酸溶液を各ウェルに100 μ lずつ加えて反応を停止させた。次に反応を終了した各ウェルをOD 492nmで測定して、M-CSF標準曲線を作成した。

【0138】上記で作成された標準曲線を第2図に示す。

【0139】図において縦軸は492nmでのOD（吸光度）を、横軸はE. coli [3-153] M-CSFの濃度（ng/ml）をそれぞれ示す。

【図2】



34

【0140】②CHO由来CHO [-32-522] M-CSFのELISA法

上記実施例9-①と同様にして、CHO由来CHO [-32-522] M-CSFの標準曲線を作成した。

【0141】その結果、得られた測定系の内、抗体が第1抗体としてANOC573モノクローナル抗体を、第2抗体としてOCT511ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチの系が、最も測定感度が良好であった。このANOC573とOCT511の組合わせによるM-CSFの標準曲線を第3図〔横軸：492nmでのOD、縦軸：CHO [-32-522] M-CSF濃度（pg/ml）〕に示す。

【0142】該図より、本発明のヒトM-CSF測定系の感度は約20pg/mlであることが判る。

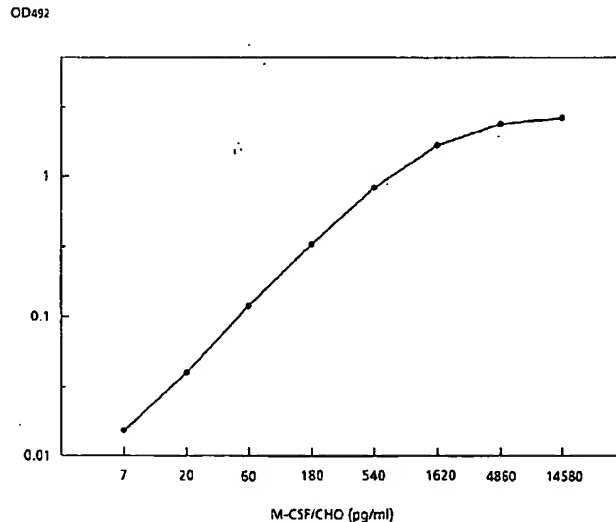
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2に従う本発明抗体のウエスタンブロッティング分析結果を示す。

【図2】実施例9に従う大腸菌由来のM-CSFを利用したM-CSFの標準曲線を示す。

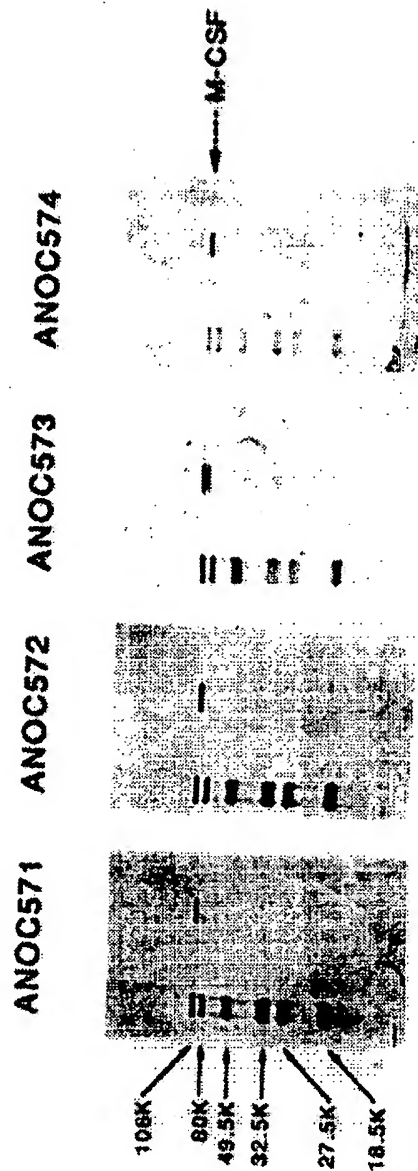
【図3】実施例9に従うCHO細胞由来のM-CSFを利用したM-CSFの標準曲線を示す。

【図3】



【図1】

ウエスタンブロッティング



図面代用写真

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
// A 61 K 39/395

識別記号 庁内整理番号
M 8413-4C
U 8413-4C

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 5/20
15/06
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

(20)

特開平5-95794

(72)発明者 山西 一也

徳島県徳島市大原町東千代ケ丸19-139

(72)発明者 高橋 真行

徳島県鳴門市大津町木津野字仲ノ越79-7